



Gökkuşığı Alabalıklarında İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz'un Patogenezi Üzerine Deneysel Bir Araştırma: Tip 1 İnterferonların İnate (Doğal) Bağışıklıktaki Rolü

Nihat Toplu¹, Emre Özan², Tuba Çiğdem Oğuzoğlu³, Harun Albayrak⁴, Erkmen Tuğrul Epikmen¹, Emrah İpek¹, Ayşe Nur Akkoç¹

¹Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, ²Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü, ³Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, ⁴Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı,

ÖZET

Öz bilgi/Amaç: İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz (IPN), değişik balık türlerinde pankreasın nekrozu ile karakterize, akut, bulaşıcı, sistemik viral bir hastalıktır. Etken, RNA grubundan Aquabirnavirüs ailesinde IPN virusu (IPNV)'dur. Bu çalışma ile, Türkiye'deki bir alabalık işletmesinden izole edilen IPNV izolatu ile deneysel enfeksiyon gerçekleştirilerek; alabalıklarda, doğal bağışıklıkta önemli yeri olan virus-konakçı hücre ilişkileri (interaksiyonları)'nde interferonların rolü araştırılmıştır.

Materyal ve Metot: Deneysel enfeksiyonu takiben nekropsileri gerçekleştirilen hayvanlarda dokular parafinde bloklandı. Viral antijen ve tip1 interferon ve reseptörlerinin lokalizasyonu ve yoğunluğu için enzim tabanlı immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi.

Sonuç: Alabalıkların IPNV ile deneysel enfeksiyonunda, Tip-1 interferon ve reseptörlerinin enfekte dokularda ekspresyonları belirgin şekilde görülmesine karşın, viral replikasyonu kısmen bloke ettiği ve persiste enfeksiyonun kurulumunun önüne geçemediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Alabalık, Histopatoloji, İmmunohistokimya, İnfeksiyöz pankreatik nekrozis, İnterferon

An Experimental Study on Pathogenesis of Infectious Pancreatic Necrosis in Rainbout Trout: The Role of Tip 1 Interferones in Innate Immunity

ABSTRACT

Background/Aim: Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) is an acute, contagious, systemic viral disease characterized by necrosis of the pancreas in different fish species. The agent is the IPN virus (IPNV) in the Aquabirnavirus family from the RNA group.

Material and Method: An experimental infection with IPNV isolate isolated from a trout company in Turkey was carried out. After necropsy applications, the tissues were embedded in paraffin and prepared sections 5 µm in diameter. For determination of IPNV antigen and expression of tip-1 interferon and their receptor, enzyme based immunohistochemistry was applied on tissue sections.

Conclusion: Experimental infection of trout with IPNV showed that although expression of Tip-1 interferon and its receptors in the infected tissues was not clearly visible, it partially blocked viral replication and could not prevent the establishment of persistent infection.

Key words: Trout, Histopathology, Immunohistochemistry, Infectious pancreatic necrosis, Interferon

Giriş

Enfeksiyöz Pankreatik Nekroz (IPN), değişik balık türlerinde pankreasın nekrozu ile karakterize, akut, bulaşıcı, sistemik viral bir hastalıktır. Özellikle yavru ve genç salmonid balıklarda yüksek mortalite ile seyrederek. Etken Aquabirnavirus generusunda yer alan IPN virusu (IPNV)'dur (Roberts, 2001; Candan, 2002; Erer, 2002; Santi ve ark., 2005).

IPN özellikle yavru (fry ve fingerling) salmonidlerde perakut ve akut formlarda % 20-100'e varabilen yüksek mortaliteye yol açar. Bu durum bakım-besleme, suyun fiziksel ve kimyasal kalitesine bağlı olarak azalır artabilir. Salmonid balıklarda mikroskopik olarak lezyonlar özellikle pankreas, karaciğer ve bağırsak mukozasında görülür. Pankreasta yaygın asiner ve Langerhans adacık hücrelerinin nekrozu ile ekzokrin bezlerde intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri göze çarpar (Roberts, 2001; Erer, 2002; Smail ve ark., 2006). Histopatolojik bulguların işaret ettiği karakteristik lezyonlar eşliğinde; dokularda viral antijenin immunohistokimyasal demonstrasyonu ve RT-PCR ile akuatik *Birnavirus* nükleotidlerinin gösterilmesi ile IPN hastalığı teşhis edilmektedir (Sweeney ve ark., 1997). IPN viral antijenleri, histolojik değişikliklerle uyumlu olarak sırasıyla en yoğun şekilde pankreas, karaciğer ve bağırsaklarda göze çarpar. Buna karşın, pankreastaki nekrotik sahaların genişlemesi ile immunopozitif reaksiyonların zayıfladığı bildirilmiştir. Böyle sahalarda viral antijen yoğunluğundaki azalmanın virusun antijenik

kodlarını. IFN γ , çoğunlukla T lenfosit ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilmektedir ve etkileri IFN γ reseptörüne (IFN γ R) sahip hücrelerde görülür (Schoenborn ve Wilson, 2007). Tip 3 interferon ailesinde yer alanlar IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) olmakla birlikte son zamanlarda keşfedilen IFN λ 4 de bu aileye eklenmiştir. Bu ailedeki interferonlar, tip 1 interferon ailesindeki sitokinlerle benzer görevlere sahiptir. Buna karşın, reseptörleri çoğunlukla epitel hücrelerinde olması nedeniyle, etkinlikleri de bu hücrelerle sınırlıdır (O'Brien ve ark., 2014).

IFN α ve IFN β (IFN α/β)'nın en bilinen özelliği, virüsle enfekte ve enfekte olmayan hücrelerde virüsün üremesini durdurmasıdır. Bu interferonlar reseptörlerine bağlandığında virüs replikasyonunu farklı aşamalarda durduran proteinlerin sentezi uyarılır (Yan ve Chen, 2012). Bununla birlikte, görevleri bununla sınırlı değildir. Virüslerin yanı sıra bakteriyel ve diğer patojenlere karşı gelişen doğal ve adaptif immun yanıtların düzenlenmesinde de etkileri bulunmaktadır. Spesifik enfeksiyonlar sırasında uyarılan IFN α/β cevabının sonuçları birbirinden farklılık göstermektedir. IFN α/β 'nın tip 1 interferon reseptörüne bağlanması takiben hangi sinyal yollarının etkinleştiği ya da etkinleşen sinyal yollarının interferon tarafından kontrol edilen genlerden hangilerini aktive veya inhibe ettiği interferon cevabının sonuçlarını değiştirmektedir (McNab ve ark 2015).

Tablo 1. Deneme grupları ve inokulasyon sonrası gün (İSG) nekropsisi tarihi.

Grup Adı	Balık büyüklüğü ve ağırlığı	Toplam hayvan sayısı	İSG (1-5 gün arası)	İSG 10. gün	İSG 15. gün	İSG 20. gün	İSG 25. gün
Grup I (Deneme)	2-3 cm-15±3 g (yavru)	40 balık	5+5+5+5=20 adet	5 adet	5 adet	5 adet	5 adet
Grup I (Kontrol)	2-3 cm-15±3 g (yavru)	16 balık	2+2+2+2=8 adet	2 adet	2 adet	2 adet	2 adet
Grup II (Deneme)	10-12 cm-80±10 gr (Erişkin)	40 balık	5+5+5+5=20 adet	5 adet	5 adet	5 adet	5 adet
Grup II (Kontrol)	10-12 cm-80±10 gr (Erişkin)	16 balık	2+2+2+2=8 adet	2 adet	2 adet	2 adet	2 adet

yapısının zarar görmesiyle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Sonuç olarak, IPN'nin immunohistokimyasal olarak tanısında pankreasın yanı sıra diğer dokularda örneklenmelidir (Toplu ve ark., 2010). IPNV erişkin ve damızlık balıklarda genellikle subklinik ya da asemptomatik olarak seyrederek. Böyle balıklar, özellikle yumurtlamada olduğu gibi stresli koşullarda, virüs dışkıları ile saçmaları nedeniyle horizontal bulaşma kaynağını oluştururlar. Virüsün böyle hayvanlarda nasıl persiste kaldığı, konakçı hücrelerde innate (doğal) immuniteden nasıl kaçtığı araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

Doğal bağışıklıkta virüslerin hücrede replikasyonunu ve yeni jenerasyonlarının oluşumunu engelleyen tip 1 interferonların salınımının, *in vitro* kültürlerde IPNV'ye karşı etkin bir şekilde kullanılmadığı görülmüştür (Toplu ve ark., 2010). Tip 1, tip 2, tip 3 olmak üzere birbirinden farklı üç tip interferon ailesi mevcuttur. Tip 1 interferon ailesinde, IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN τ (tau), IFN κ , IFN ω , IFN δ ve IFN ζ (zeta) yer almaktadır. Bu ailede IFN α dışındaki diğer interferonlar tek bir genin ürünüyken, IFN α 'nın kısmen homoloji gösteren 13 alt tipi mevcuttur (Pestka ve ark., 2004). Tip 2 interferon ailesinde, yalnızca IFN γ (gama) yer almaktadır ve bu molekül tek bir genden

Deneyisel olarak oluşturulan kontrollü subklinik enfeksiyon tablosunda virüs enfekte hücrelerin doğal immunitenin ana savunma mekanizmalarından olan tip 1 interferon ekspresyonlarının durumunu belirlemek sunulan çalışmanın amacını oluşturmuştur.

Materyal ve Metot

IPNV materyali

Çalışmada kullanılacak IPNV izolatu, Karadeniz bölgesindeki özel alabalık işletmelerinden "Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Gökkuşluğu Alabalık Çiftliklerinde İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virusunun İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Dizi Analizi" isimli ve TAGEM/HS/10/09/02/178 no'lu projede kapsamında izole edilen ve RT-PCR ile identifiye edilen izolatu hatlarından seçildi. İzolatu üretilmesi ve titrasyonu BF-2 ve EPC hücre hatlarında standart yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi.

Hayvan Materyali ve Deneyisel İnokulasyon

Bu araştırma için Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 26 Ağustos 2011 tarih ve B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2011/051 sayılı yazı ile etik

kurul izni alınmıştır. Çalışmada kullanılan alabalıklar entegre bir alabalık işletmesinden temin edildi. Balıkların seçildiği işletmede geçmişte IPN'ye ilişkin salgınların görülmediği bildirildi. Çalışmada ADÜ Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Akvaryum Ünitesinde yer alan 100x70x50 cm boyutlarında 4 adet havuz kullanıldı. Balıklar konulmadan önce havuzlar %5'lik formaldehid solüsyonu ile iki saat süreyle dezenfekte edildi. Suyun havalandırılması, her bir havuzda saatte 1200 litre suyu filtre edebilen dış (eksternal) akvaryum filtreleri ve hava pompaları ile yapıldı. Denemede kullanılan suyun mikrobiyolojik ve kimyasal analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yapıldı. Sudaki çözünmüş oksijen miktarı Aydın Tarım İl Müdürlüğü Laboratuvarında belirlendi. Bu analizler sonucunda, suyun alındığı kaynaktaki çözünmüş oksijen miktarı ile havalandırma sonrası ve havuzlara gelen sudaki çözünmüş oksijen miktarının standart aralıklarda olduğu belirlendi. Suyun sertlik derecesi ve pH'sı da gökkuşağı alabalıkları için uygun aralıktaydı. Oksijen takviyeli taşıma tanklar ile getirilen yavru (2-3 cm-15±10 g ağırlığında) ve erişkin (10-12 cm-80±10 gr ağırlığında) gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) önceden hazırlanan havuzlara alındı. Deneysel enfeksiyon oluşturmadan önce balıkların ortama adapte olmaları için 15

İmmunohistokimyasal İnceleme

Nekropsiyi takiben alınan doku örnekleri 12-24 saat % 10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Trimleme işleminin ardından 6-8 saat süre ile akan çeşme suyu ile yıkanan dokular doku takip cihazında (Leica TP1020) bilinen yöntemlerle, alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan 4-5 µm kalınlığında Poly-L-Lysine kaplı lamlara kesitler alındı (Mikrotom, Leica RM 2135). Alınan kesitler immunohistokimyasal incelemeler için kullanıldı. Seri halde alınan doku kesitlerinde viral antijen, interferon α1 ve interferon α/β reseptör ifadesinin immunohistokimyasal olarak gösterilmesi amacıyla, işaretli streptavidin-biotin (LSAB) yöntemi ilgili firmanın (Invitrogen® Histostain® Plus Detection Kit, USA) önerdiği şekilde uygulandı. Kullanılan primer antikorların sulandırması ve özellikleri Tablo2'de sunulmuştur. Negatif kontrol olarak primer antikor yerine PBS kullanıldı. Tüm kesitlerin aynı şartlarda ve prosedürde boyanmasından sonra, sonuçlar ve dokulardaki ekspresyon yoğunlukları ışık mikroskopunda semikantitatif olarak değerlendirildi ve mikroskopik dijital fotoğraflar (Olympus C-5050) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

IHC Sonuçlarının Analizi

Tablo 2. Kullanılan primer antikorların özellikleri

Primer antikor	Amaç	Sulandırma oranı	Marka
Anti-IPNV monoklonal antikor	Viral antijenlerin saptanması	1/10	Aquatic Diagnostic Ltd. P06
Anti-IFN α1	Tip 1 interferon belirteci	1/500	BIOSS Bs-1578R
Anti-IFN α/βRβ	Tip 1 interferon reseptörü belirteci	1/100	Santa Cruz Sc-83257

IHC

gün beklenildi. Bu süre sonunda balıklar ayrıntıları Tablo 1'de verildiği şekilde kontrol ve deneme grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Çalışma boyunca balıklar her gün düzenli olarak yemlendi. Deneme süresince havuz sularının % 25'i dinlenmiş ve havalandırılmış sularla her gün düzenli olarak değiştirildi. Atk suların dezenfeksiyon işlemi ise formalin solüsyonu ile gerçekleştirildi.

Denemeye başlamadan önce her bir gruptan rastgele örnekleme yapılarak alınan balıklar IPN, VHS ve IHNV enfeksiyonlarının varlığı yönünden incelenmek üzere Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na gönderildi. PCR sonuçlarına göre, balıklardan hiç birinde yukarıda belirtilen hastalıklara yönelik pozitiflik tespit edilmediği bildirildi.

Deneysel enfeksiyon öncesi, balıkların anestezileri %0.25'lik fenoksietanol solüsyonu ile gerçekleştirildi. Grup 1 ve 2'de yer alan balıklarda IPNV deneysel enfeksiyonu oluşturmak amacıyla, 100DKID₅₀ 10^{-2.7}/0,1ml dozdaki inokulumdan her bir balığa 100 µL olacak şekilde intraperitoneal yolla verildi. Kontrol gruplarındaki balıklara da anesteziyi takiben virus inokulumunun hazırlanmasında kullanılan sulandırma solüsyonundan her bir balığa 100 µL olacak şekilde intraperitoneal yolla verildi. İnokulasyonu takiben balıklar her 8 saatte bir kez izlenerek klinik bulgular kaydedildi.

Tablo 1'de verildiği gibi, deneme gruplarında inokulasyonu takiben 1., 3., 5., 10., 15., 20., 25. günlerde beşer balık ötenazi edildi. Kontrol gruplarında da deneme gruplarında örnekleme yapılan aynı günlerde ikişer balık ötenazi edildi. Ötenazi işlemi gerçekleştirildikten sonra dokular (baş, solungaçlar, pankreas, pilorik kese, bağırsaklar, böbrek, dalak, karaciğer, deri, kalp, iskelet kası) % 10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu ile tespit edildi.

Doku kesitlerinde, viral antijen, interferon α1, interferon α/β reseptör ifadesinin immunohistokimyasal olarak incelenmesi sonucunda belirlenen subjektif veriler sayısal verilere dönüştürüldü. Bu amaçla her bir hayvanın pankreas, mide ve bağırsaklar, böbrek ve dalak dokularından alınan örneklerde 40'lık objektif altında, her biri toplam 100 gridlik (10x10) ve toplamı 0.025 mm²'ye eşit 10 ayrı alan incelendi ve sayısal verilere dönüştürüldü. Buna göre incelenen alanlarda % 1-4 hücrenin immunopozitifliği (+1), % 5-8 hücrenin immunopozitifliği (+2), %9-15 hücrenin immunopozitifliği (+3), %15-20 hücrenin immunopozitifliği (+4), %21> hücrenin immunopozitifliği (+5) olarak değerlendirildi.

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Pankreas, mide ve bağırsakta günler arasında (1.-25. günler) değişkenler açısından (IPNV antijen pozitif hücreler ve interferon/interferon reseptörü) istatistiksel farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. p<0,05 anlamlı kabul edildi (Özdamar 2013).

Klinik ve Nekropsi Bulguları

Kontrol grubundaki balıklarda deney süresi boyunca herhangi bir klinik bulguya rastlanmadı. Deney grubundaki balıklarda ise, virusun inokulasyonunu takiben 3. günde 5 balıkta durgunluk ve koordinasyonsuz yüzme hareketleri görüldü. 3. günde yapılan örnekleme sırasında bu balıklar seçilerek ötenazi edildi ve nekropsileri yapıldı. Bu balıkların nekropsisinde herhangi bir makroskopik bulguya rastlanmadı. Daha sonraki günlerde klinik olarak herhangi bir bulguya rastlanmadı. Deney süresi boyunca kontrol ve deney grubundaki hiçbir balıkta ölüm görülmedi.

Deney süresince planlanan günlerde yapılan nekropsilerde kontrol ve deney grubundaki balıklarda kayda değer bir bulguya

Tablo 3. Viral antijen, interferon ve interferon reseptör ifadelerinin organlara ve enfeksiyon sürecine göre dağılımı (D) ve şiddeti (Ş)

Günler	Pankreas			Bağırsak			Mide		
	Viral antijen	interferon	interferon reseptör	Viral antijen	interferon	interferon reseptör	Viral antijen	interferon	interferon reseptör
1.gün	(D) ++	+++	++++	++	+++	++++	++	+++	++++
	(Ş) +++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++
2.gün	(D) +++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
	(Ş) ++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+++
3.gün	(D) ++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
	(Ş) ++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	++++
5.gün	(D) +++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
	(Ş) +++++	++	++++	++++	+++	++++	++	+++	++++
10.gün	(D) ++++	+++	++++	+++	+++	++++	++	++	+++
	(Ş) +++	++	++++	++	+++	+++	+	+++	++
15.gün	(D) +++	+++	++++	+++	+++	++++	+	++	+++
	(Ş) ++++	+++	++++	++	+++	++++	+	+++	+++
20.gün	(D) ++	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++
	(Ş) ++	++	++	++	+	++	+++	+	+++
25.gün	(D) ++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++
	(Ş) ++	+	+++	+	+	++	+++	+	++

rastlanmadı.

İmmunohistokimyasal Bulgular

Viral antijenin immunohistokimyasal bulgularının organlara ve enfeksiyon sürecine göre dağılımı ve şiddeti Tablo 3'te verilmiştir. Pankreasta viral antijen lokalizasyonu genel olarak granüler, daha az olarak da diffuz boyanmalar şeklinde ekzokrin asiner epitelinin sitoplazmasında belirlendi. Viral antijen dağılımı inokulasyonun 1. gününden itibaren artış gösterdiği ve 5-10. günler arası pik seyirde seyrettiği ve daha sonra inokulasyonun 25. gününe kadar da azalma eğiliminde olduğu görüldü (Tablo 3).

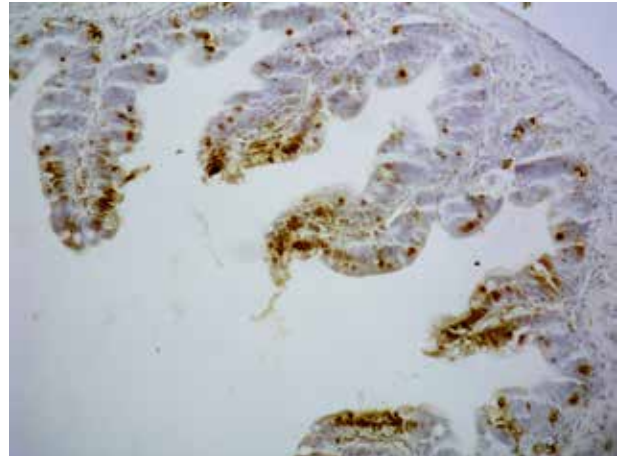
Viral antijen bağırsak villus ve kript epitelinin sitoplazmalarında lokalize olduğu görüldü. Mide ve bağırsaklarda da viral antijen dağılımı pankreasta olduğu gibi bir seyir izlemekte idi (Tablo 3) (Şekil 1).

Karaciğer, dalak ve böbreklerde viral antijen dağılımı ve şiddeti bakımından pankreas, mide ve bağırsaklara göre daha düşük pozitif reaksiyonlar olsa da, pozitif reaksiyonların dağılımı ve şiddeti inokulasyon günlerine göre benzer yükseliş ve düşüşler göstermişti. Karaciğerde viral antijen özellikle Kupfer hücreleri ve daha az olmak üzere hepatosit sitoplazmalarında görüldü. Anterior böbrekte viral antijen lenfoid hücrelerin sitoplazmasında, posterior böbrekte ise lenfoid hücrelerin yanı sıra yer yer tubulus epitelileri ile nadiren de glomeruler kapillar damar endotelinde dikkati çekti.

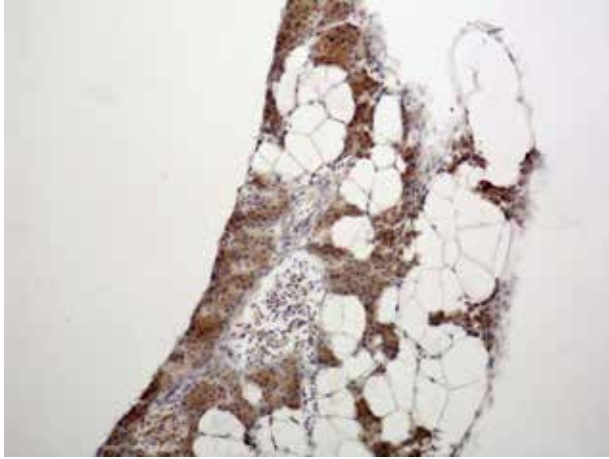
Dalakta da pozitif reaksiyonlar lenfoid ve retiküler hücre sitoplazmalarında kaydedildi.

Pankreas, mide ve bağırsaklarda Tip 1 interferon ve reseptörlerin

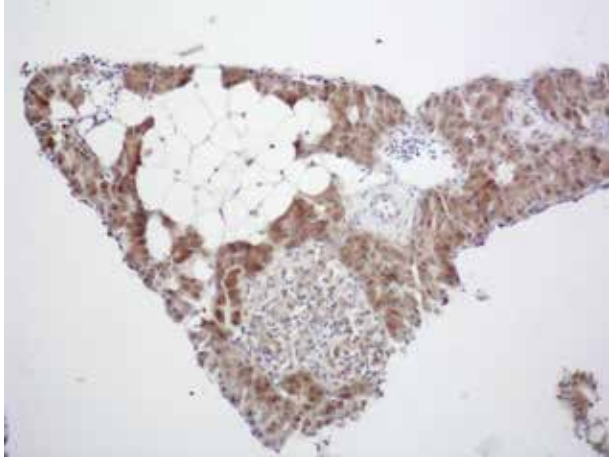
ekspresyonunun viral antijen yoğunluğu ile doğru orantılı olarak epitel hücrelerinde artış gösterdiği belirlendi. İnokulasyonun 1.-15. günler arasında şiddetli pozitif reaksiyonlar görülürken, inokulasyonun 20.-25.günleri arasındaki balıklarda ise ekspresyonların azalmaya başlayarak daha düşük yoğunlukta reaksiyonların elde edildiği görüldü (Şekil 4, 5, 6). Viral antijen, tip 1 interferon ve reseptörlerin ifadelerinin organ ve enfeksiyon sürecine göre dağılımı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildiğinde pankreas, mide ve bağırsaklarda günler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.



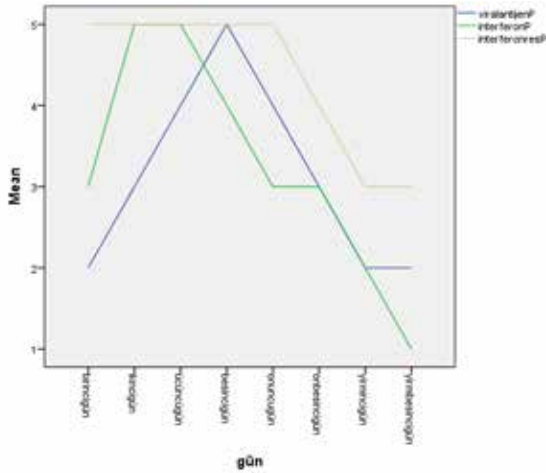
Şekil 1. Bağırsak epitelinde viral antijen immunopozitif reaksiyonlar.



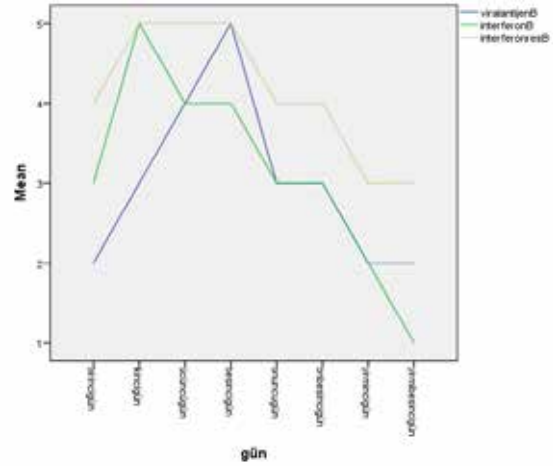
Şekil 2. Pankreas asiner epitellerinde interferon immunoreaktivitesi



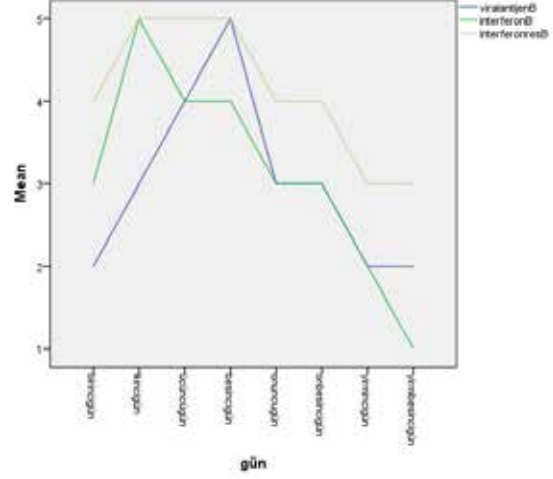
Şekil 3. Pankreas asiner epitellerinde interferon reseptör immunoreaktivitesi.



Şekil 4. Pankreasta viral antijen, interferon ve interferon reseptör belirteçlerinin ifadelerinin günlere göre dağılımı.



Şekil 5. Midede viral antijen, interferon ve interferon reseptör belirteçlerinin ifadelerinin günlere göre dağılımı.



Şekil 6. Bağırsakta viral antijen, interferon ve interferon reseptör belirteçlerinin ifadelerinin günlere göre dağılımı.

Tartışma ve Sonuç

Klinik olarak yavru balıklarda (fry ve fingerling) sıklıkla kaydedilen gelişim geriliği, durgunluk, deride depigmentasyon gibi klinik bulgular ile perakut ya da akut ölümler, çalışma olgularında dikkati çekmedi. Bu durum çalışmada kullanılan büyük balıkların (150 gr) perakut ve akut enfeksiyonlara dirençli olması ile ilişkilendirilmiş ve çalışmanın amacını oluşturan persistent enfeksiyonun kurulumunu da sağlamıştır.

IPN viral antijen pozitif reaksiyonlar akut enfeksiyon sürecinde, histolojik değişikliklerle uyumlu olarak sırasıyla en yoğun şekilde pankreas, karaciğer ve bağırsaklarda göze çarpar (Toplu ve ark.,2010; Ahne ve Thomsen, 1986). Subklinik ya da persiste enfeksiyon olgularında ise viral antijen mide ve bağırsaklar, karaciğer ve böbreklerde lokalize olduğu görülmüştür. Damızlık hayvanlarda ise virus gonadlarda lokalize kalarak vertikal bulaşma kaynağını oluşturur (Imajoh ve ark., 2005). Çalışmada 100DKID₅₀ 10^{-2,7}/0,1ml dozlarda intraperitoneal yolla verilen hayvanlarda IPN virusu verilerek subklinik enfeksiyon oluşturulmuş, inokulasyonun 1.,2., 3., 5.,10.,15. ve 20. Günlerinde 5'er hayvan ötanazi edilerek viral antijen lokalizasyonu ve tip 1 interferon ekspresyonları immunohistokimyasal metot ile değerlendirilmiştir. Viral antijen persiste enfeksiyonlarla uyumlu olarak (Imajoh ve ark., 2005), en yaygın olarak pankreas, mide ve bağırsaklar ve daha az yaygınlıkta ise karaciğer, böbrek ve dalakta lokalize kaldığı görülmüştür. Viral antijen dağılımı ve şiddeti bu dokularda genel olarak inokulasyonun 3-10. günleri arası artış gösterirken, 15-25. günler arasında azalan bir grafik sergilemiştir. Bu da enfekte kalan hayvanların sindirim ve üriner sistem aracılığı ile

virusun yayılımına ve horizontal bulaşmaya zemin hazırladığı görülmektedir.

Güçlü bir interferon uyarıcısı olduğu bilinen poly I:C'nin transfeksiyon ajanı yardımıyla hücrelere transfeksiyonunu takiben hücrelerin IPNV ile inokülasyonu virusun titresine azalmaya neden olmaktadır. Poly I:C'nin transfeksiyonu sonrası medyumda interferon aktivitesinin tespit edilmesi ve eş zamanlı olarak virusun titresinin azalması interferon sisteminin IPNV'un çoğalmasını etkili bir şekilde önlediğini göstermektedir (Saint-Jean ve Perez-Prieto, 2005). Benzer şekilde, IPNV'nin enfeksiyonu öncesi hücrelerin rekombinant Atlantik salmon interferon α 1 ile transfeksiyonunun IPNV'nin yapısal proteinlerinden VP2'nin olgunlaşmasını önlediği gösterilmiştir (Skjesol ve ark., 2009). Sunulan çalışmada, pankreas, mide ve bağırsaklarda tip 1 interferon ve reseptörlerinin ekspresyonunu viral antijen yoğunluğu ile doğru orantılı olarak artış göstermektedir. İnokülasyonun 1.-15. günleri arasında ifadesi kademeli olarak artan bu belirteçlerin ifadesi daha sonraki günlerde aynı şekilde kademeli olarak azalmıştır. Deneysel enfeksiyonun ilk günlerinde virusun çoğalmaya başlaması ile birlikte Tip1 interferonun ifadesinin arttığının bulunması, viral enfeksiyonlarda virusun çoğalmasını önleyici mekanizmalardan biri olan interferon sisteminin IPNV enfeksiyonu sırasında da aktive olduğunu göstermektedir. Buna karşın, interferon ifadesinin azalmaya başladığı dönemde pankreas, mide ve bağırsaklardaki viral antijen yoğunluğu artış eğilimindedir. Bununla birlikte, ilerleyen günlerde interferon ifadesi azalmakla birlikte virus yoğunluğunda da azalma tespit edilmiştir. Bu durum interferon sisteminin aktivasyonunun IPNV'un çoğalmasının önlenmesindeki önemini ortaya koymaktadır. IPNV'un akut ve persiste enfeksiyonu sırasında interferon sisteminin aktive olmadığını bildiren çalışmalar (Reyes-Cerpa ve ark., 2014) bulunmakla birlikte, bunun aksine iddaa eden çalışmaların sayısı da az değildir (Saint-Jean ve Perez-Prieto, 2005; Skjesol ve ark., 2009). Sunulan çalışma sonuçları da IPNV enfeksiyonun başlangıcında yoğun şekilde ekprese olan tip-1 interferon salınımı olmasına karşın, persiste enfeksiyon kurulumunu engelleyemediği görülmektedir. Persiste enfeksiyon kurulumunda derin öngörüler için farklı mekanizmaların yeni hipotezlerle çalışılması gerekmektedir.

Teşekkür

Sunulan çalışma Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (AGEM/HSGYAD/13/A11/P03/34) 'nce desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Ahne W, Thomsen I (1986). Infectious pancreatic necrosis: detection of virus and antibodies in IPNV-carrier rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Veterinary Medicine B*, 33:552-4.
- Candan A (2002). First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 22:45-47.
- Erer H (2002). Balık Hastalıkları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Imajoh M, Hirayama T, Oshima SI (2005). Frequent occurrence of apoptosis is not associated with pathogenic infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) during persistent infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 18:163-177.
- McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*, 15:87-103.
- O'Brien TR, Prokunina-Olsson L, Donnelly RP (2014). IFN λ 4: the paradoxical new member of the interferon lambda family. *J Interferon Cytokine Res*, 34:829-838.
- Özdamar K (2013). SPSS ile Biyoistatistik 9. Baskı 2013 Nisan Kitabevi.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 202:8-32.
- Reyes-Cerpa S, Reyes-Lopez F, Toro-Ascuy D, Montero R, Maisey K, Acuna-Castillo C, Sunyer JO, Parra D, Sandino AM, Imarai M (2014). Induction of anti-inflammatory cytokine expression by IPNV in persistent infection. *Fish & Shellfish Immunol*, 41:172-182.
- Roberts RJ (2001). *Fish Pathology* (3rd ed.). Toronto: W. B. Saunders.

Saint-Jean SR, Pérez-Prieto SI (2008) Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. *Vet Imm and Immunopathol.*, 110(1-2):1-10.

Santi N, Sandtrø A, Sindre H, Song H, Hong JR, Thu B, Wuf JL, Vakhari VN, Evensen Ø (2005). Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. *Virology*, 342:13-25.

Schoenborn JR, Wilson CB (2007). Regulation of interferon gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, 96:41-101

Skjesol A, Aamo T, Hegseth MN, Robertsen B, Jørgensen JB (2009). The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection. *Virus Research*, 143:53-60.

Smail DA, Bain N, Bruno DW, King JA, Thompson F, Pendrey DJ, Morrice S, Cunningham CO (2006). Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *J Fish Dis*, 29:31-41.

Sweeney A, Blake S, Singer JT, Nicholson BL (1997). Detection and identification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) by polymerase chain reaction (PCR), p. 42-47. In Inui Y, Winton J (ed.), *New Approaches to Viral Disease of Aquatic Animals*. National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Japan.

Toplu N, Albayrak H, Aydoğan A, Epikmen ET, Metin N (2010). Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) enfeksiyöz pankreatik nekrozun patogenezisinde apoptozisin rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57:191-196.

Yan N, Chen ZJ (2012). Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunol*, 13:214-222.